

201210004B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗HIV化学療法剤の開発
(H22-政策創薬-一般-005)

平成22-24年度 総合研究報告書

研究代表者 松岡 雅雄
(京都大学ウイルス研究所・教授)

平成25 (2013) 年 3月

目 次

I. 総合研究報告

新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗 HIV 化学療法剤の開発	-----	1
研究代表者・松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）		

II. 分担研究報告

1. 藤井 信孝（京都大学薬学研究科・教授）	-----	6
大石 真也（京都大学薬学研究科・講師）		
2. 村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長）	-----	31
3. 志村 和也（京都大学ウイルス研究所・助教）	-----	36

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・刊行物・別刷

1. 松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）	-----	39
志村 和也（京都大学ウイルス研究所・助教）		
2. 藤井 信孝（京都大学薬学研究科・教授）	-----	75
大石 真也（京都大学薬学研究科・講師）		
3. 村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長）	-----	196

新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗 HIV 化学療法剤の開発

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 教授 松岡 雅雄

研究要旨 本研究では、既存の抗 HIV 薬に抵抗性を示す薬剤耐性 HIV の制御が可能な新規抗 HIV 薬の開発を目的とする。我々は抗 HIV 活性を有する PD 404182 を見出しており、本研究課題で高活性誘導体の創製を行った。また、PD404182 は HIV 感染最初期に作用している可能性が考えられ、その作用点はウイルス側に存在し、具体的には、ウイルスエンベロープあるいはこれに関連する分子が強く示唆された。また、マウスに対する毒性評価を行った結果、耐受性が高いことが判明した。CXCR4 阻害剤に関する研究では、CXCR4 阻害剤耐性 HIV は、中和抗体に高感受性を示すことが判明した。

A. 研究目的

HIV 感染症に対して、数種類の抗 HIV 薬を組み合わせて服用する多剤併用療法の確立は、HIV 感染者の予後を著しく改善した。しかしながら、AIDS 発症を防ぐためには終生にわたる服薬が不可避である。同時に、HIV は易変異性であるため、長期治療者は必然的に薬剤耐性 HIV が出現しやすい状況下にある。また、近年では、HIV の初感染時において既に薬剤耐性変異が検出される例も報告されている。以上のように、効果的な抗 HIV 療法において、薬剤耐性 HIV の出現は、服薬が長期になるにつれて新たに出現してきた障壁である。この問題に対処するため、既存の薬剤に耐性を示す HIV の制御が可能な新規標的に作用する阻害剤の同定が急務となっている。本研究課題では、未治療標的に対する小分子化合物を基盤とした新規抗 HIV 化学療法剤の開発を主目的とする。個別の課題として、これまでに見出した新規骨格を有する複数の小分子化合物を基に、富士フィルム株式会社と京都大学の連携により、効率的な構造最適化研究および作用点解析による新規抗 HIV 剤の開発研究ならびに耐性プロファイルの解析や高活性誘導体の開発による CXCR4 選択的阻害剤の実用化へ向けた研究を行う。

B. 研究方法

抗 HIV 活性小分子化合物の創製（ピリミドベンゾチアジン骨格）

構造活性相関研究を行うため、PD 404182 の構造をヘテロ原子部位、ベンゼン環部位、

アミジン環部位の 3 つに細分化し、種々の誘導体を作製した。

抗ウイルススペクトル解析

PD404182 ならびに高活性誘導体の抗ウイルススペクトル解析を行った。対象ウイルスとして、HIV（レポーター法）、インフルエンザ A ウイルス（PR8 株）[MTT 法]、アデノウイルス（Ad5）[luciferase 法]、ヒト単純ヘルペスウイルス 2 型[プラーク法]を用いた。

Time of drug addition assay

96-well プレートに播種した MAGI/CCR5 細胞に、HIV-1_{IIIB} を感染させ、感染から 0、2、4、6、8、10、12、24、および 48 時間後に PD 404182 および高活性誘導体を添加した。作用点既知の各種抗 HIV 剤[DS5000（吸着阻害剤）、T-20（融合阻害剤）、AZT（核酸系逆転写酵素阻害剤）、NVP（非核酸系逆転写酵素阻害剤）、RAL（インテグラーゼ阻害剤）]を対照として用いた。上記の各種化合物は、予め算出した EC₉₀ 値（HIV-1 の感染を 90% 阻止する濃度）で用い、抗 HIV 活性は、multinuclear activation of a galactosidase indicator (MAGI) 法により評価した。

作用点の解析

化合物の前処理群として、高タイターの HIV-1_{IIIB} 粒子と 100 μM の PD 404182 を混合し、37°C で静置した。90 分後、本混合物を 1000 倍希釈し、MAGI/CCR5 細胞に感染させ

た。一方、後処理群では、PD 404182 の代わりに終濃度を揃えた DMSO と同タイターのウイルス粒子を混合した。本混合物を細胞に添加する際に 100 nM の PD 404182 を加えた。両群とも感染 48 時間後に MAGI 法によりウイルス粒子の感染性を評価した。

PD 404182 のマウス毒性試験

日本クレアより入手した Jcl:ICR マウス (雌・6 週齢) に対して、PD 404182 を 30 mg/kg、10 mg/kg、3 mg/kg、あるいは 1 mg/kg で 1 日 1 回の腹腔内投与を行い、これを 3 日連続で行った。その後 1 週間にわたり、体重の増減を指標として評価した。溶媒コントロールとして、1%DMSO 溶液を用いた。

抗 HIV 活性小分子化合物の創製 (ピラゾール骨格)

ピラゾール骨格を有する新規抗 HIV 化合物の様々な誘導体を作製し、構造活性相関研究を行った。

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 誘導実験

PM1/CCR5 細胞を標的細胞として、X4 株である NL4-3 をウイルスとして用い、KRH-3955、KRH-3148、AMD3100、AMD070 の 4 種の CXCR4 阻害剤の EC₅₀ 付近の濃度を初発濃度としてウイルス培養を開始し、薬剤耐性ウイルスの出現を CPE や培養上清中の p24 濃度で判断して、添加する薬剤濃度を段階的に増加させ、耐性株を誘導した。

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の中和抗体感受性試験

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株由来の Env 組換え NL4-3 の中和抗体感受性を、447-52D および 2F5 について評価した。

(倫理面への配慮)

PD 404182 に係る動物実験は京都大学ウイルス研究所内で行い、京都大学が定める動物実験の指針に沿って行った。

C. 研究結果

抗 HIV 活性小分子化合物の創製 (ピリミドベンゾチアジン骨格)

ヘテロ原子部位を変換した化合物では、

活性値が大きく減少した。また、ベンゼン環部位の 8 位に置換基を導入した場合や、9 位に極性官能基を導入した場合においても活性が消失した。9 位及び、10 位に臭素原子を導入した化合物において、2 倍程度の活性値の向上が認められた。続いて、この臭素基を利用して様々な官能基を導入した誘導体を作製した。その結果、ジメチルアミノ基やメトキシ基、スチリル基、ペンテニル基などを導入した種々の誘導体では、活性のさらなる向上は認められなかった。

一方、アミジン環の構造活性相関研究において、メチル基を導入した誘導体や、六員環の代わりに七員環としたアミジンでは、活性の向上が認められた。

抗ウイルススペクトル解析

現在までに開発されている抗ウイルス剤は、適用可能なウイルス種が比較的限られている。広範な抗ウイルス活性を示す薬剤は、現在の新興・再興ウイルス感染症に対抗可能な有効なツールとなり得る可能性を有する。そこで、本研究課題で扱う新規抗 HIV 活性小分子化合物の、HIV 以外のウイルスに対する活性を解析し、得られた抗ウイルススペクトラムから対応可能なウイルス感染症を明らかにすると共に、感受性ウイルスに共通する分子を解析し、標的分子・作用機序解明に情報をフィードバックすることを目的として研究を行った。

新規抗 HIV 活性小分子化合物は、インフルエンザ A ウイルス (PR8 株) に、対照化合物として用いたリバビリンと同程度の活性を示した。また、ヒト単純ヘルペスウイルス 2 型に対しても、抗 HIV 活性より劣るが、ウイルスの複製を抑制した。しかしながら、アデノウイルスの感染は抑制しなかった。HIV やインフルエンザ A ウイルス、ヒト単純ヘルペスウイルスはエンベロープウイルスであるが、アデノウイルスはエンベロープを有しないことから、新規抗 HIV 活性小分子化合物はウイルスエンベロープを標的としている可能性が示唆された。

Time of drug addition assay

本評価法では、作用点既知の抗 HIV 剤を用いて、ウイルス感染後の経時的な抗 HIV 活性プロファイルと比較することにより、標的化合物の作用点を推測するものである。本試験では、ウイルスのライフサイクル順に、吸着・融合・逆転写・インテグレーションの各ステップに対する阻害剤を対照に用いて、PD 404182 および高活性誘導体の作用機序解明を試みた。その結果、PD 404182 および試験に用いた全ての高活性誘導体は、いずれも吸着阻害剤である DS5000 に類似のプロファイルを示した。

作用点の解析

本解析では、PD 404182 の作用点がウイルス側に存在するのか、標的細胞側に存在するのかを明らかにすることを目的とした。PD 404182 の高濃度溶液 (100 μ M) で予め処理した HIV-1 (前処理群) は、溶媒コントロールの対照群と比較して、1%以下の感染性を示した。一方、細胞感染時に PD 404182 を加えた HIV-1 (後処理群) は、約 80%程度の感染性を有していた。AZT を用いて同様の実験を行ったが、前処理群、後処理群とも約 70~80%程度の感染性を有していた。

PD 404182 のマウス毒性試験

Jcl:ICR マウスに PD 404182 を 30 mg/kg の用量で 1 日 1 回、3 日間連続投与した結果、死亡例は認められなかった。また、その後の体重の増減も溶媒コントロールとの間に大きな差は認められなかった。

抗 HIV 活性小分子化合物の創製 (ピラゾール骨格)

5-アミノピラゾール構造を有する誘導体はリード化合物に匹敵する活性を示した。そこで、より活性が高い本誘導体をもとに構造活性相関研究を展開した。その結果、右側のベンゼン環上やピラゾール環状の置換基およびアミド構造を検討したが、活性の向上につながる知見は得られなかった。次に、ピラゾール N-1 位のフェニル基上の置換基効果を検討した結果、ビフェニル体に高い活性が認められた。この誘導体を基に、さらなる高活性誘導体を創製するため、*m*-フェニル基の置換基効果を精査した結果、*m*-位、もしくはパラ位にメチル基を導入

した化合物やジクロロ体で活性の向上が認められた。

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 誘導実験

PM1/CCR5 細胞を標的細胞として、NL4-3 を親株とした薬剤耐性株誘導実験を開始した。実験開始時の薬剤濃度は EC_{50} よりやや低い濃度に設定し、ほぼ 4 日おきに 1:5 に培養物を継代した。ウイルス感染による CPE が培養全体に観察されるようになった時点で薬剤濃度を 1.5 倍上昇させた。なお、コントロールとして薬剤無添加での感染細胞の継代培養 (この場合は、CPE でほぼ完全に細胞が死滅するので培養上清のみを継代した) も併行して行った。DNA を抽出した時点での薬剤濃度は、KRH-3955、KRH-3148、AMD3100、AMD070 でそれぞれ 15、750、3000、4500 nM である。

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の中和抗体感受性試験

いずれの CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株由来の Env 組換え NL4-3 も gp120 V3 ループをエピトープとする中和抗体である 447-52D および gp41 の膜貫通領域近傍をエピトープとする中和抗体である 2F5 に対する感受性が上昇していた。

D. 考察

本課題では、新規標的に作用する小分子抗 HIV 薬の開発に焦点を当てて研究を行ってきた。抗 HIV-1 活性を有する新規小分子化合物 (ピリミドベンゾチアジン骨格: PD 404182) に関する研究では、ヘテロ原子部位を置換した化合物では、抗 HIV 活性が低下したことから、この部位が標的分子と相互作用していることを示唆している。また、ベンゼン環部位の 8 位への置換基導入により抗 HIV 活性が低下したことは、標的分子との結合の際に、この付近に立体障害が生じることを示唆している。さらには、9 位、10 位に疎水性官能基を導入することで活性の上昇が認められたことから、ピリミドベンゾチアジン骨格のベンゼン環周辺には標的物質との疎水性の相互作用が存在すると考えられる。PD 404182 は、HIV 以外の、エンベロープを有するヒト病原性ウイルス

に対しても活性を示したことから、標的分子はウイルスエンベロープ中に存在することが強く示唆された。実際に、time of drug additionの結果から、PD 404182の作用点は、ウイルスの細胞への吸着過程を含む感染最初期であることが確認された。本化合物の標的は細胞側因子ではなく、ウイルス粒子中に存在するといった結果からも、本化合物が選択的にウイルス粒子中存在する分子に作用して抗ウイルス活性を示していることが推測された。また、マウスは本化合物に対して比較的高い耐容性を示した。

CXCR4阻害剤の研究においては、得られた耐性プロファイルの解析から、KRH-3955とAMD3100、KRH-3148とAMD070のCXCR4への類似の作用機序が推測された。今回得られたCXCR4阻害剤耐性HIV-1株のEnv領域の変異は、Envを標的とする中和抗体に対する感受性を高める変異であり、実際にHIV感染者体内で今回使用したCXCR4阻害剤を投与した場合は、出現しても淘汰される可能性が示唆された。

E. 結論

PD 404182に関する研究では、高活性化に必要な部位を同定し、実際にリード化合物に比べ、4倍強い活性値を示す誘導体を得た。抗ウイルススペクトル解析やtime of drug addition assayなどから、本化合物はウイルス粒子中存在する分子に影響を与えることで、感染性を消失させていると推測された。また、抗ウイルス活性発揮のためには、予めウイルス粒子と接触している必要があるため、感染予防薬としての適用が考えられる。

CXCR4阻害剤に関する研究では、試験管内でのCXCR4阻害剤耐性HIV-1の誘導を通じ、新規CXCR4阻害剤の耐性プロファイル解析、分子モデリング解析およびコレセプター利用性解析などにより、小分子CXCR4阻害剤開発に有用な知見や、耐性HIVの性質に関する情報が得られた。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Izumi K, Nakamura S, Nakano H, Shimura K, Sakagami Y, Oishi S, Uchiyama S, Ohkubo T, Kobayashi Y, Fujii N, Matsuoka M, Kodama EN. Characterization of HIV-1 resistance to a fusion inhibitor, N36, derived from the gp41 amino terminal heptad repeat. *Antiviral Res.* 87(2) 179-186 (2010)
2. Shimura K, Nameki D, Kajiwaru K, Watanabe K, Sakagami Y, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Sarafianos SG, Kodama E. Resistance profiles of novel electrostatically constrained HIV-1 fusion inhibitors. *J. Biol. Chem.* 285(50) 39471-39480 (2010)
3. Inokuchi E, Oishi S, Kubo T, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Potent CXCR4 antagonists containing amidine-type peptide bond isosteres. *ACS Med. Chem. Lett.* 2(6) 477-480 (2011)
4. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Concise synthesis and anti-HIV activity of pyrimido [1,2-*c*][1,3]-benzothiazin-6-imines and related tricyclic heterocycles. *Org. Biomol. Chem.* 10(33) 6792-6802 (2012)
5. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Structure-activity relationship study of pyrimido[1,2-*c*][1,3]-benzothiazin-6-imine derivatives for potent anti-HIV agents. *Bioorg. Med. Chem.* 20(21) 6434-6441 (2012)
6. Tanaka G, Nakase I, Fukuda Y, Masuda R, Oishi S, Shimura K, Kawaguchi Y, Takatani-Nakase T, Langel U, Gräslund A, Okawa K, Matsuoka M, Fujii N, Hatanaka Y, Futaki S. CXCR4 stimulates macropinocytosis: implications for cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides and HIV. *Chem Biol.* 19(11) 1437-1446 (2012)
7. Izumi K, Kawaji K, Miyamoto F, Shimane K, Shimura K, Sakagami Y, Hattori T, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Kaku M, Sarafianos SG, Kodama EN. Mechanism of resistance to S138A substituted enfuvirtide and its application to peptide design. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45(4) 908-915 (2013)
8. Togami H, Shimura K, Okamoto M, Yoshikawa R, Miyazawa T, Matsuoka M.

Comprehensive in vitro analysis of simian retrovirus type 4 susceptibility to antiretroviral agents. *J. Virol.* 87(8) 4322-4329 (2013)

9. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Design and synthesis of biotin- or alkyne-conjugated photoaffinity probes for studying the target molecules of PD 404182. *Bioorg. Med. Chem.* 21(7) 2079-2087 (2013)

2. 学会発表

1. 志村和也、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：HIV-1 膜融合阻害剤に対する新規耐性メカニズムの解析：第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月 30 日 - 12 月 2 日
2. Kenji Sugata, Yorifumi Satou, Jun-ichirou Yasunaga, Kisato Nosaka, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor perturbs immune response to the pathogens in vivo by inhibiting IFN-gamma production: 15th INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.
3. 志村和也、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：HIV-1 膜融合阻害剤に対する新規耐性メカニズムの解析：第 25 回日本エイズ学会学術集会、東京、2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日
4. 志村和也、水原司、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：広範なスペクトルを有する新規抗 HIV 薬の同定とその開発：第 26 回日本エイズ学会学術集会、東京、2012 年 11 月 24 日-26 日
5. 戸上博昭、志村和也、宮沢孝幸、松岡雅雄：ニホンザルより検出された SRV-4 に対する抗 HIV 薬の効果：第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月 13 日-15 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 新規ケモカイン受容体拮抗剤
日本：特願2011-044035：出願（2011年3月1日）
外国（PCT）：JP2012/055099：出願（2012年2月29日）
発明者：藤井信孝、大野浩章、大石真也、

井ノ口恵利子、久保達彦、松岡雅雄、志村和也；出願者：京都大学

2. ピリミドベンズチアジン-6-イミン誘導体またはその塩を含有するウイルス感染症の治療および／または予防のための薬剤
日本：特願2011-105642：出願（2011年5月10日）
日本：特願2012-50334：優先権出願（2012年3月7日）
外国（PCT）：JP2012/061890：出願（2012年5月9日）
発明者：前田英樹、加藤貴之、松岡雅雄、志村和也、藤井信孝、大野浩章、大石真也、水原司；出願者：京都大学、富士フイルム

2. 実用新案登録

該当事項無し

3. その他

該当事項無し

新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗 HIV 化学療法剤の開発

研究代表者： 京都大学ウイルス研究所 教授 松岡 雅雄
研究分担者： 京都大学大学院薬学研究科 教授 藤井 信孝
京都大学大学院薬学研究科 講師 大石 真也

研究要旨 ピリミドベンゾチアジン骨格およびピラゾール骨格を有する新規低分子抗 HIV 活性化化合物の構造最適化研究を展開し、強力な抗 HIV 活性に必要な部分構造を同定した。また、PD 404182 の標的分子を同定することを目的とした光アフィニティープローブを設計し標的分子探索を行った。CXCR4 拮抗剤 FC131 に新たな塩基性官能基を付与した誘導体を作成し、従来の拮抗剤と比較して約 20 倍強力な抗 HIV 活性を示す分子を見出した。また、FC131 とその高活性誘導体の受容体結合様式を明らかにするとともに、薬物動態特性に関する知見を得た。

分担研究項目 1：抗 HIV 活性小分子化合物の創製

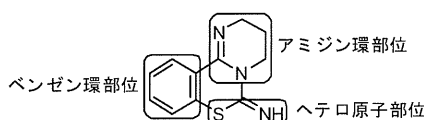
1-1：ピリミドベンゾチアジン誘導体の構造最適化（1）（平成 22 年度）

A. 研究目的

研究グループでは、新規抗 HIV 活性化化合物の探索を目的としたランダムスクリーニングを行い、pyrimidobenzothiazin-6-imine 骨格を有する PD 404182 が抗 HIV 活性を示すことを見出している。研究グループで開発した PD 404182 の 2 種類の合成法を用いることにより、強力な抗 HIV 活性を示す PD 404182 誘導体の探索を目的として、各種化合物の合成と抗 HIV 活性評価を行った。

**B-C. 研究方法・結果
PD 404182 の誘導体合成**

Figure. 1 The structure of PD 404182 (1).



構造活性相関研究を行うために、PD 404182 の構造をヘテロ原子部位、ベンゼン環部位、アミジン環部位の 3 つに細分化した (Figure 1)。

まず、ベンゼン環部位に様々な置換基を有する化合物の合成を行った。必要な置換基を有するアルデヒド **2** に対して、酸化的アミジン化反応を行い、テトラヒドロピリ

ミジン誘導体 **3** を合成した。化合物 **3** を二硫化炭素との芳香族求核置換反応により、化合物 **4** へと変換後、チオカルボニル基の加水分解、続く臭化シアンとの反応により目的物である PD 404182 誘導体 **1a-f** を得た (Table 1)。

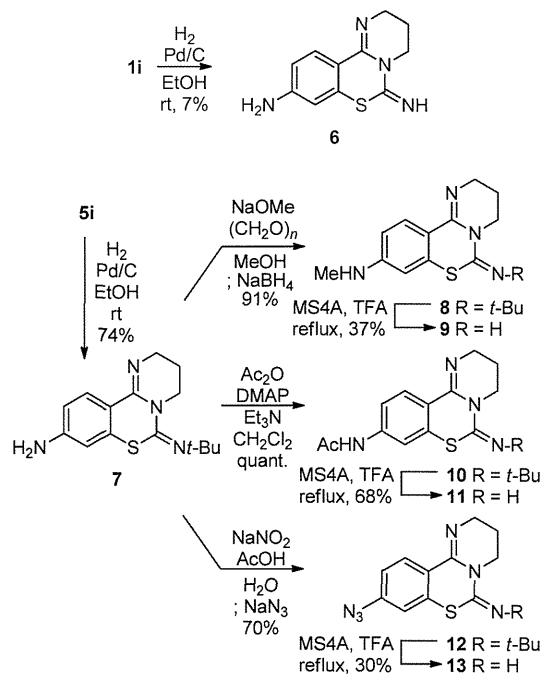
Table 1. Synthesis of PD 404182 derivatives.

entry	yield of 3	yield of 4	yield of 1
1	3a: R = H, X = F (71%)	4a: R = H (86%)	1a: R = H (61%)
2	3b: R = OMe, X = F (67%)	4b: R = OMe (95%)	1b: R = OMe (61%)
3	3c: R = Me, X = Br (88%)	4c: R = Me (88%)	1c: R = Me (68%)
4	3d: R = F, X = Br (97%)	4d: R = F (76%)	1d: R = F (52%)
5	3e (90%)	4e (quant.)	1e (63%)
6	3f (95%)	4f (71%)	1f (32%)

Table 2. Synthesis of PD 404182 derivatives.

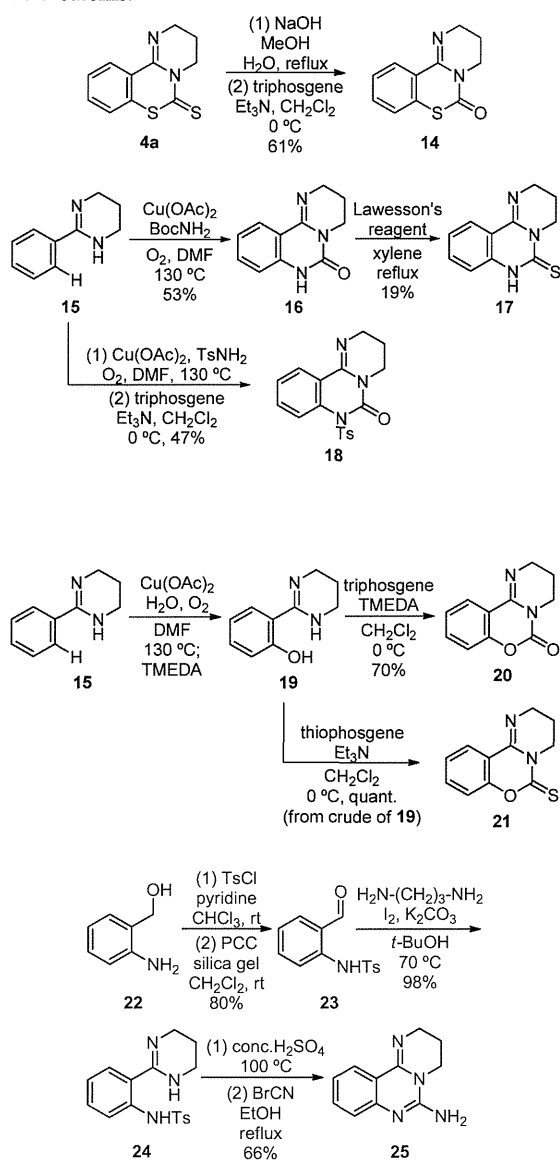
entry	yield of 3	yield of 5	yield of 1
1	3a: R = H, X = F (71%) 3g: R = 4-Br, X = F (81%)	5a: R = H (62%) 5g: R = 9-Br (88%)	1a: R = H (85%) 1g: R = 9-Br (91%)
2	3h: R = 4-CF ₃ , X = F (65%)	5h: R = 9-CF ₃ (64%)	1h: R = 9-CF ₃ (84%)
3	3i: R = 4-NO ₂ , X = F (97%)	5i: R = 9-NO ₂ (62%)	1i: R = 9-NO ₂ (63%)
4	3j: R = 3-Br, X = F (69%)	5j: R = 8-Br (95%)	1j: R = 8-Br (71%)
5	3k: R = 5-Br, X = F (79%)	5k: R = 10-Br (77%)	1k: R = 10-Br (89%)
6	3l: R = 6-F, X = F (78%)	5l: R = 11-F (73%)	1l: R = 11-F (90%)
7			
8	3m (68%)	5m (49%)	1m (57%)

Scheme 1. Synthesis of derivatives bearing nitrogen functional group.



上記と同様の操作により合成した、テトラヒドロピリジン誘導体 **3** に対して、*tert*-ブチルイソチオシアネートとの芳香族求核

Scheme 2. Synthesis of the compounds containing other heteroatoms.



置換反応を行った後、*tert*-ブチル基の脱保護を行い、目的物 **1a,1g-m** を得た (Table 2)。

アミノ基を有する化合物 **6** は、ニトロ基を有する化合物 **1i** を接触還元することにより得た (Scheme 1)。また、**5i** を還元し、化合物 **7** を得た。化合物 **7** に対し、還元的アミノ化を行った後、*tert*-ブチル基の脱保護を行い、化合物 **9** を得た。また、化合物 **7** をアセチル化した後、*tert*-ブチル基の脱保護を行い、化合物 **11** を得た。化合物 **7** のアミノ基をザンドマイヤー反応により、アジド基に変換し、*tert*-ブチル基を脱保護することで、化合物 **13** を得た。

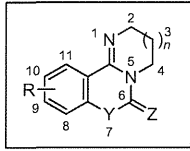
続いて、ヘテロ原子部位に酸素原子、窒素原子、硫黄原子のいずれかを異なった組み合わせで有する誘導体の合成を行った (Scheme 2)。まず、二硫化炭素との芳香族

求核置換反応によって得た化合物 **4a** に対し、チオカルボニル基の加水分解を行った後、トリホスゲンを用いたカルボニル化反応を行い、化合物 **14** を得た。

一方で、2-フェニルテトラヒドロピリミジン **15** を、銅触媒を用いた C-H 官能基化反応により BocNH₂ と反応させ、化合物 **16** とし、Lawesson 試薬を作用させ、化合物 **17** を得た。また、TsNH₂ と反応させた後、トリホスゲンを用いてカルボニル化することで、トシル基を有する化合物 **18** を得た。また、**15** を C-H 官能基化反応により、水と反応させることで、化合物 **19** を得た後、トリホスゲンによるカルボニル化を行い、化合物 **20** を得た。一方、化合物 **19** をチオホスゲンと反応させることで、化合物 **21** を得た。

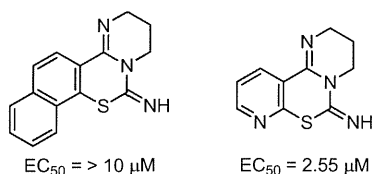
続いて、2-アミノベンジルアルコール **22** をトシル化、PCC 酸化により、化合物 **23** に変換後、酸化のアミジン化、トシル基の脱保護、臭化シアンとの反応により、化合物 **25** を得た。

Table 3. Anti-HIV activity of PD 404182 and the related compounds.



entry	R	Y	Z	n	EC ₅₀ (μM)
1	H	S	NH	1	0.44
2	H	S	O	1	8.94
3	H	S	S	1	>10
4	H	N	NH ₂	1	>10
5	H	NH	S	1	>10
6	H	NH	O	1	>10
7	H	NTs	O	1	>10
8	H	O	S	1	>10
9	H	O	O	1	>10
10	9-OMe	S	NH	1	0.57
11	9-Me	S	NH	1	0.49
12	9-F	S	NH	1	0.49
13	9-CF ₃	S	NH	1	0.53
14	9-NO ₂	S	NH	1	1.13
15	9-NHMe	S	NH	1	>10
16	9-NH ₂	S	NH	1	>10
17	9-NHAc	S	NH	1	>10
18	9-N ₃	S	NH	1	0.43
19	9-Br	S	NH	1	0.25
20	8-Br	S	NH	1	>10
21	10-Br	S	NH	1	0.23
22	11-F	S	NH	1	1.67
23	H	S	NH	0	>10

Figure 2. Anti-HIV activity of the related compounds.



抗 HIV 活性評価

合成した化合物を、MAGI アッセイを用いて活性評価を行った (Table 3, Figure 2)。

ヘテロ原子部位を変換した化合物では、活性値が大きく減少した。また、ベンゼン環部位の 8 位に置換基を導入した場合や、9 位に極性官能基を導入した場合においても活性が消失した。9 位及び、10 位に臭素原子を導入した化合物において、2 倍程度の活性値の向上が認められた。またベンゼン環をナフタレン環やピリジン環に変換すると著しく活性が低下した。

以上より、申請者らが開発した C-H 官能基化反応、及び芳香族求核置換反応を用いることで、さらに高い活性を有する PD 404182 誘導体を見出すことに成功した。

(倫理面への配慮)

該当事項なし (ヒトや動物を用いた実験を含まない)

D. 考察

PD 404182 誘導体は以前に開発した C-H 官能基化反応や、芳香族求核置換反応を用いることで容易に合成が可能であった。

ヘテロ原子部位の変換により活性値が減少したことは、この部位が標的物質と相互作用している可能性を示唆している。また、8 位への置換基の導入により活性値が減少した事は、標的物質との結合の際に、この付近に立体障害が生じることを示唆している。また、9 位に親水性の置換基を導入した際に活性が消失した事は、この付近での疎水性相互作用が活性発現に重要であることを示唆している。

E. 結論

C-H 官能基化反応や芳香族求核置換反応を用いて、PD 404182 の誘導体の合成を行い、その抗 HIV 活性の評価を行った。その結果、PD 404182 の活性発現における重要な構造活性相関情報を取得した。

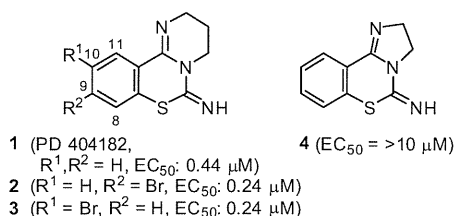
1-2: ピリミドベンゾチアジン誘導体の構造最適化 (2) (平成 23 年度)

A. 研究目的

平成 22 年度までに展開した構造活性相関研究により、**1** の 9 位もしくは 10 位に臭素原子を導入した化合物 **2** または **3** が **1** に比較して約 2 倍の活性を示すことを見出し

た。また、アミジン環部位を五員環に変換すると活性が著しく低下するという興味深い結果を得た (Figure 1)。そこで、9 位もしくは 10 位の臭素基を利用して様々な官能基を導入することで、より高活性な化合物が得られると考え、構造最適化研究を行った。さらに、アミジン環の環拡大や置換基導入を含めた構造活性相関研究を行い、アミジン環の修飾の効果について精査した。

Figure 1 Structure of PD 404182 (1), and the potent anti-HIV derivatives (2-4).

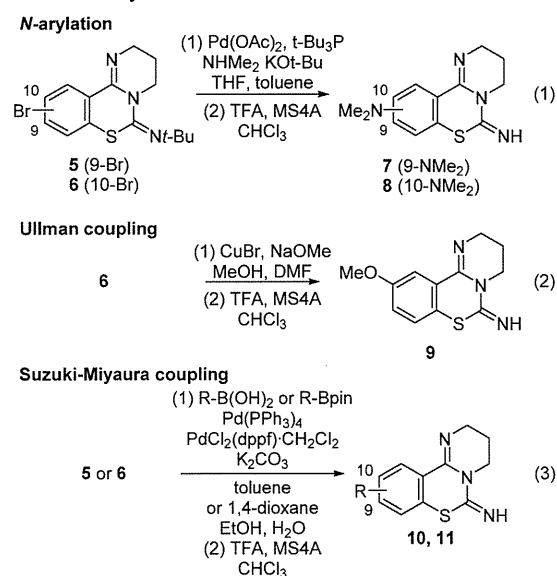


B-C. 研究方法・結果

PD 404182 の誘導体合成

まず、合成した化合物 **5** 及び **6** のそれぞれに対し、*N*-アリール化 (式 1)、ウルマンカップリング (式 2) もしくは鈴木宮浦カップリング (式 3) を行った。続いて TFA により *tert*-ブチル基を脱保護することで、目的とする PD 404182 誘導体 **7-11** を高収率で得た (Scheme 1)。

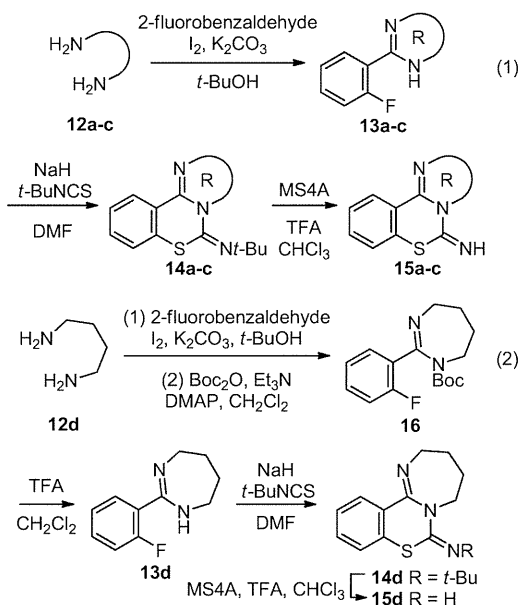
Scheme 1. Synthesis of PD 404182 derivatives.



続いて、アミジン環上に官能基を導入した化合物の合成を行った (Scheme 2)。六員環のアミジン **13a-c** の形成は問題なく進めた (式 1) が、七員環のアミジンの形成は効率よく進行しなかった。そこで、反

応混合物に対し、Boc₂O を作用させ Boc 保護体 **16** として単離した (式 2)。引き続き、TFA により **16** の Boc 基の脱保護を行い、純粋な七員環のアミジン **13d** を得た。*tert*-ブチルイソチオシアナートとの芳香族求核置換反応と続く *tert*-ブチル基の脱保護により PD 404182 誘導体 **15a-d** を合成した。

Scheme 2. Synthesis of PD 404182 derivatives.



合成した化合物の抗 HIV 活性評価

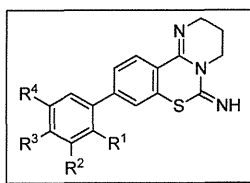
合成した化合物を、MAGI アッセイを用いて活性評価を行った (Table 1-4)。

Table 1. Anti-HIV activity of PD 404182 derivatives.

entry	R ¹	R ²	EC ₅₀ (μM)
1	NMe ₂	H	4.74
2	H	NMe ₂	2.12
3	H	OMe	0.53
4	Ph	H	0.24
5	H	Ph	0.24
6	CH ₂ =CH	H	0.18
7	H	CH ₂ =CH	0.40
8	PhCH=CH	H	0.25
9	<i>n</i> -PrCH=CH	H	0.24
10	<i>n</i> -Bu	H	0.40

まず、*N*-アリール化により 9、10 位にジメチルアミノ基を導入した化合物では、活性が著しく低下した (Table 1)。また、メトキシ基を 10 位に導入した場合は PD404182 に比較して、活性がやや低下した。続いて、Ph 基やビニル基などの疎水性官能基を導入した化合物を検討した。Ph 基の導入は 9 位でも 10 位でも対応する Br 体と同等の活

Table 2. Anti-HIV activity of PD 404182 derivatives.



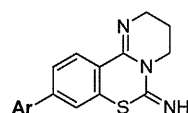
entry	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	EC ₅₀ (μM)
1	H	H	OMe	H	0.24
2	H	H	SMe	H	0.20
3	H	H	OCF ₃	H	0.38
4	H	H	CO ₂ Me	H	0.81
5	H	H	CN	H	0.44
6	H	H	CF ₃	H	0.55
7	H	H	NO ₂	H	0.46
8	H	H	CONH ₂	H	8.71
9	H	OMe	H	H	0.15
10	H	Or-Pr	H	H	0.32
11	H	Ph	H	H	1.35
12	H	CH(OH)CH ₃	H	H	1.19
13	H	CO ₂ Me	H	H	0.39
14	H	CN	H	H	1.17
15	H	NO ₂	H	H	1.26
16	H	NHAc	H	H	>10
17	H	NHMs	H	H	>10
18	H	OH	H	H	2.62
19	OMe	H	H	H	0.41
20	Ph	H	H	H	0.32
21	H	OMe	OMe	H	0.27
22	H	Cl	OMe	H	0.32
23	H	OMe	OMe	OMe	0.25
24	OMe	H	H	Cl	0.48

性を示した。一方、9 位にビニル基を有する化合物はいくらか活性が上昇したものの、10 位にビニル基を導入した場合には活性がやや低下した。そこで、9 位にスチリル基、ペンテニル基を導入したが、活性は変化しなかった。ブチル基では活性がやや低下した。

続いて、置換基を有するフェニル基を 9 位に導入した化合物を検討した。パラ位、メタ位にかかわらず、電子供与性のメトキシ基やメチルチオ基を導入した化合物で活性の維持もしくは上昇が認められた (entry 1, 2, 9, Table 2)。一方で、電子求引性基を導入したすべての化合物において活性の低下が認められた。(entry 4-7, 13-15) また、親水性の置換基の導入も活性値を大きく低下させた (entry 8, 16, 17)。

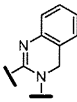



次に、9 位に様々なアリアル基を導入した化合物の活性評価を行った (Table 3)。ナフチル基では置換位置によって活性の上昇と低下が観察された (entry 1, 2)。ベンゾジオキソールを導入した場合、最も高い活性を示した (entry 3)。また、ジヒドロベンゾジオキシン体の活性は化合物 2 とほぼ同等であった (entry 4)。ピリジンを導入した場合、置換位置にかかわらず活性が低下し (entry 5, 6)、イソキノリンは活性を変化さ

Table 3. Anti-HIV activity of PD 404182 derivatives.



entry	Ar	EC ₅₀ (μM)
1		0.20
2		0.39
3		0.15
4		0.26
5		0.45
6		0.54
7		0.25
8		>1.00
9		>1.00
10		0.26
11		0.20
12		0.22
13		0.26
14		5.12
15		0.42

Table 4. Anti-HIV activity of PD 404182 derivatives.

entry	R	EC ₅₀ (μM)
1		3.78
2		0.35
3		0.24
4		0.31

せなかった (entry 7)。インドール環を有する化合物では細胞毒性が認められた (entry 8, 9)。五員環複素環では、フラン、チオフェンを導入した場合に、活性の維持もしくは改善が認められた一方で、イミダゾール、ピラゾールでは活性が低下した (entry 10-15)。

続いて、アミジン環の構造活性相関研究を行った (Table 4)。まず、ベンゼン環の縮環により活性の大幅な低下が認められた (entry 1)。一方、六員環アミジンへのメチル基の導入により、活性は上昇し (entry 2, 3)、七員環アミジンに環拡大した誘導体でも活性がやや改善した (entry 4)。

(倫理面への配慮)

該当事項なし (ヒトや動物を用いた実験を含まない)

D. 考察

9位、10位に疎水性官能基を導入することで活性の上昇が認められたことから、ピリミドベンゾチアジン骨格のベンゼン環周辺には標的物質との疎水性の相互作用が存在すると考えられる。また、アミジン環は、五員環では活性が消失したのに対し、七員環のアミジン環を有する化合物では活性の上昇が認められた。この結果は、アミジン部位を五員環にすると活性に重要なベンゾチアジンイミン骨格に歪みが生じることで活性を消失させる一方で、六・七員環ではこの分子骨格の歪みが生じないことを示唆

している。

E. 結論

平成 23 年度に見出した抗 HIV 活性化合物の構造最適化を更に展開し、PD 404182 に比べ 3 倍の活性値を示す誘導体を得た。また、さらなる構造最適化に有用な構造活性相関情報を取得した。

1-3: 抗 HIV 活性小分子化合物 PD404182 の安定性評価 (平成 24 年度)

A. 研究目的

PD 404182 及び構造活性相関研究により見出した誘導体の *in vivo* 試験に向けて、細胞培養液中での安定性を評価した。

B-D. 研究方法・結果・考察

PD 404182 の細胞培養液中での安定性を調べるため、培養液 (10% FBS 含有) 500 μL に PD 404182 の DMSO 溶液 (100 mM) を 5 μL 加え、37°C でその変化を経時変化を HPLC で確認した。その結果、徐々に HPLC 保持時間の異なる化合物に変換されていることが判明した (Figure 1, 23.4min → 23.8min, 室温での半減期: 約 1 日)。この化合物を回収し X 線結晶構造解析を行ったところ、その化学構造は 6-6-6 縮環構造を有する化合物 1 であった (Figure 2)。

Figure 1. HPLC analysis of PD 404182 in medium. HPLC conditions: 5-60% MeCN linear gradient in 0.1% NH₃ aq. over 30 min.

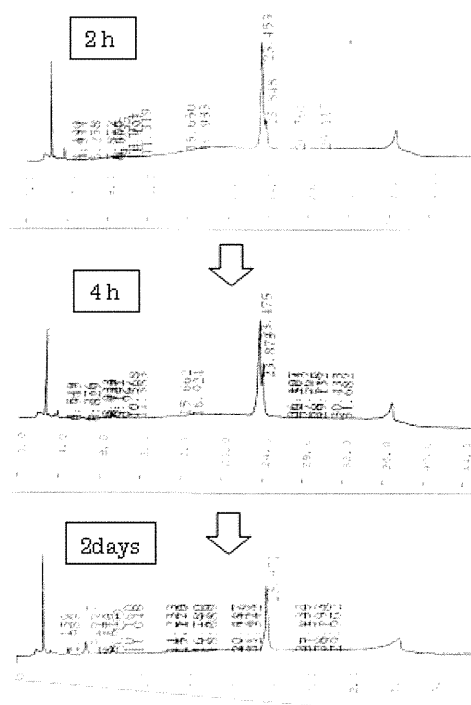


Figure 2. Structure of compound 1.

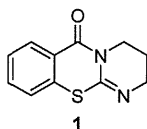
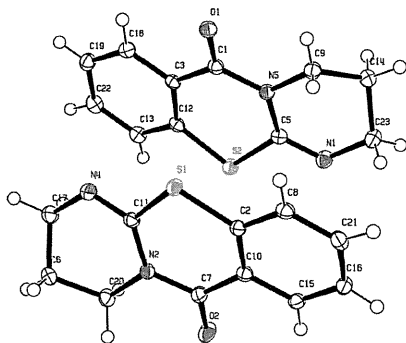


Figure 3 X-ray crystal structure of compound 1.



生成した化合物 **1** の抗 HIV 活性を、MAGI アッセイを用いて評価した。その結果、化合物 **1** は全く抗 HIV 活性を示さなかった ($EC_{50} > 10 \mu\text{M}$)。

これらの結果から、PD 404182 の細胞培養液中での安定性は非常に悪く、本化合物の *in vivo* への応用では、化合物の連続もしくは頻回投与による血中濃度の維持が必要であることが示唆された。

(倫理面への配慮)

該当事項なし (ヒトや動物を用いた実験を含まない)

E. 結論

抗 HIV 活性化合物 PD 404182 の細胞培養液中での安定性を精査したところ、PD 404182 は容易に化合物 **1** に変換されて活性を消失することが判明した。今後、この変換プロセスを精査し、培養液中での安定性を高めることを目指すと同時に、*in vivo* 評価のプロトコール作成に活用する。

F. 健康危険情報

該当事項なし

1-4: 抗 HIV 活性小分子化合物の光アフィニティープローブの合成 (平成 22 年度)

A. 研究目的

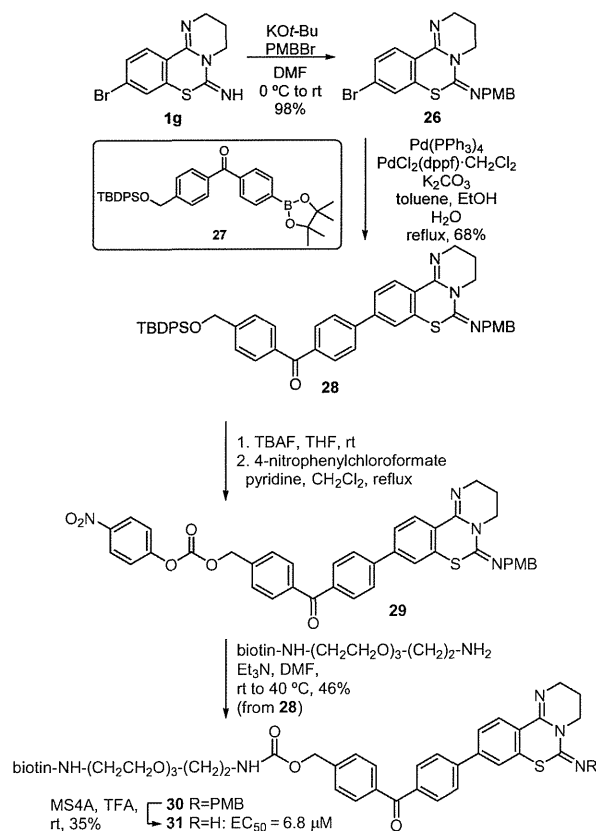
PD 404182 の標的分子を同定するための光アフィニティープローブを作成する。光感受性官能基としてベンゾフェノン

を付与する。これらの修飾化合物がもとの化合物と同等の抗 HIV 活性を示すことを常時確認しながら分子設計と化学合成を展開する。

B-C. 研究方法・研究結果

ベンゼン環部位から光感受性官能基とビオチンを導入したもの、及び、アミジン環から導入したものの 2 種類のプローブを設計した。

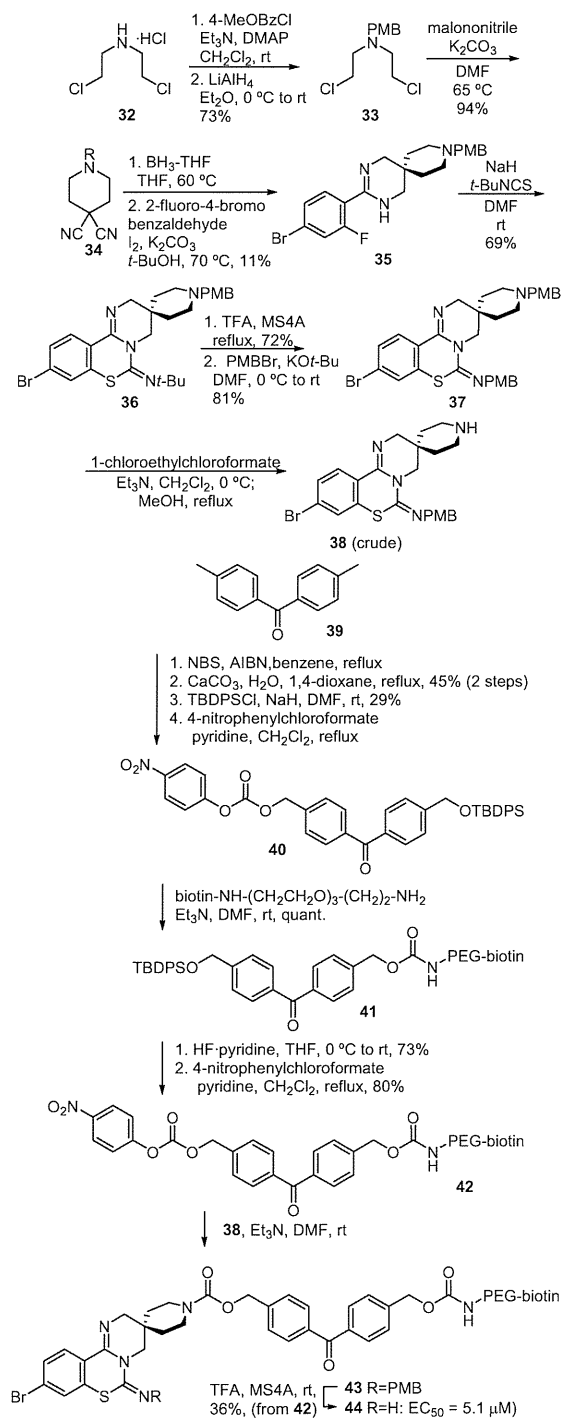
Scheme 1. Synthesis of compound 32.



まず、ベンゼン環部位から導入したプローブ **31** の合成を行った。化合物 **1g** のイミンの窒素原子を PMB で保護し、別途調製したボロン酸ピナコールエステル誘導体 **27** との鈴木カップリングにより、化合物 **28** を得た。続いて、TBDPS 基の脱保護、4-ニトロフェニルカルボネート化、ビオチンアミンとの反応を行い、化合物 **30** を得た後、PMB 基を脱保護することで、化合物 **31** を得た。化合物 **31** は中程度の抗 HIV 活性を示した ($EC_{50} = 6.8 \mu\text{M}$, MAGI アッセイ) (Scheme 1)。

続いて、アミジン環から導入したプローブ **44** の合成を行った。ビス (2-クロロエチ

Scheme 2. Synthesis of compound 44.



ル) アミン塩酸塩 **32** を PMB 化して化合物 **33** とし、マロノニトリルを塩基性条件下作用させることで、化合物 **34** を得た。ニトリル基の還元が続いて、酸化的アミジン化反応を行い化合物 **35** とした後、*tert*-ブチルイソチオシアネートを作用させ、化合物 **36** を得た。化合物 **36** のイミン窒素の保護基を PMB 基に変換し、二級アミンの PMB 基を選択的に脱保護することで、スピロ環構造を有するアミン **38** を得た。一方で、4,4'-ジメチルベンゾフェノン **39** のベンジル位

のブロモ化、加水分解、TBDPS 化、4-ニトロフェニルオキシカルボニル化を行い、化合物 **40** を得た後、ビオチンアミンと反応させることで、化合物 **41** を得た。続いて、TBDPS 基の脱保護、4-ニトロフェニルオキシカルボニル化を行い、化合物 **42** を得た。化合物 **38** と化合物 **42** を縮合させた後、PMB 基を脱保護することで、化合物 **44** (EC₅₀ = 5.1 μM) を得た (Scheme 2)。

(倫理面への配慮)

該当事項なし (ヒトや動物を用いた実験を含まない)

D. 考察

得られたプローブでは、非標識化合物と比較して抗 HIV 活性の減少が認められた。プローブとして導入した官能基の導入が活性の低下を引き起こしていることが考えられるものの、活性は 10 μM 以下であり標的の同定に用いるためには十分な活性を有していると考えられる。

E. 結論

ベンゼン環側から光感受性官能基とビオチンを導入したプローブ、及び、アミジン環側から導入したプローブの 2 種類を創製した。

1-5: 抗 HIV 活性小分子化合物の光アフィニティープローブを用いた標的分子同定研究 (平成 23 年度)

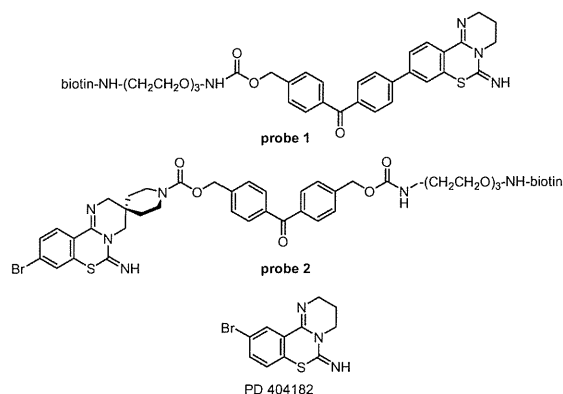
A. 研究目的

平成 22 年度に開発したビオチン標識基とベンゾフェノン光親和性官能基を有するプローブ (**1**, **2**, Figure 1) を用いて、PD 404182 の抗 HIV 作用における標的分子を同定する。

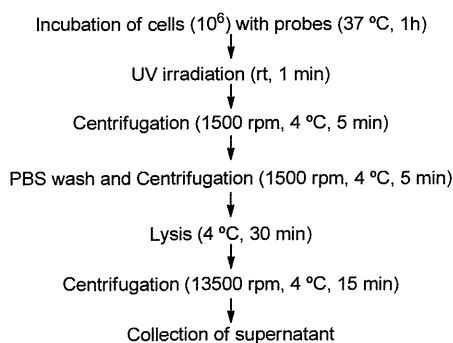
B-C. 研究方法・研究結果

まず、標的の同定実験を HIV の持続感染細胞である H9III_B 細胞を用いて行った。細胞を上記のプローブ (20 μM) 存在下、37°C で 1 時間インキュベートし、続いて UV を 1 分間照射した。細胞を回収し、遠心分離と PBS での洗浄を繰り返した後、細胞を RIPA バッファーで可溶化した。遠心分離を行い、上清中に可溶化タンパク質を得た (Scheme 1)。

Figure 1. Structures of PD 404182-based probes and competitive compound.



Scheme 1. Protocols for the preparation of cell lysate reacted with probes.



得られた可溶化タンパク質をストレプトアビジンビーズと反応させた後、RIPA バッファーで洗浄した。SDS サンプルバッファー中で 95°C に加熱して、ビオチン-ストレプトアビジン複合体を解離させ、SDS-PAGE により結合タンパク質を分離した。PVDF 膜に転写後、ストレプトアビジン-Horseradish peroxidase (HRP) により、ビオチンが結合したタンパク質を検出した (Scheme 2)。

次に、プルダウン実験にストレプトアビジンアガロースビーズを用いて行った。プローブ 1 とプローブ 2 を用いた場合のどちらにおいても、ビオチン付加タンパク質のバンドは明確に検出されなかった (Figure 2)。そこで、様々なストレプトアビジン付加ビーズを用いて実験を行ったところ、ニュートロアビジンアガロースビーズを用いた場合にバンドが強く検出された。プローブ 1 を用いた場合は、8つのバンドが検出されたが、プローブ 2 ではそれらのバンドは検出されなかった。また、プローブ 1 に加えてより高い結合親和性を持つ PD 404182 (10 μ M) を用いた場合、プローブ 1 によって検出されたタンパク質が消失した

Scheme 2. Protocols for pull-down experiment and western blotting (Sav-HRP).

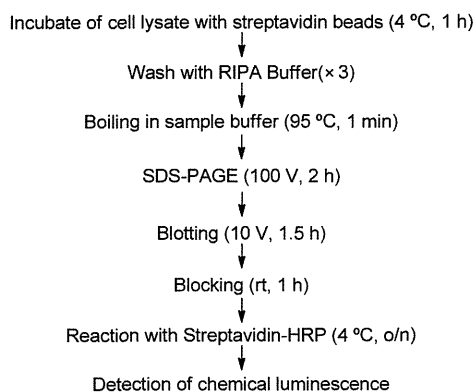


Figure 2. Western blotting of probe reacted cell lysate.

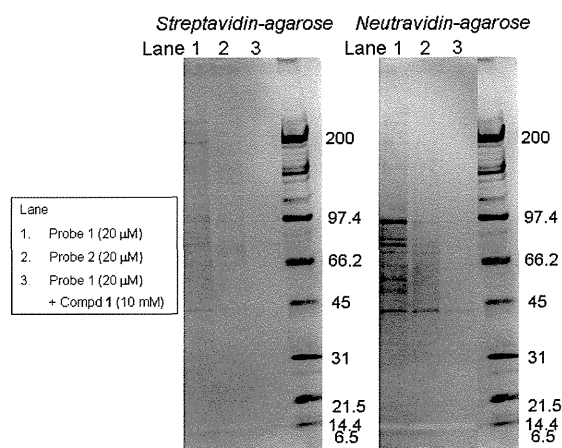
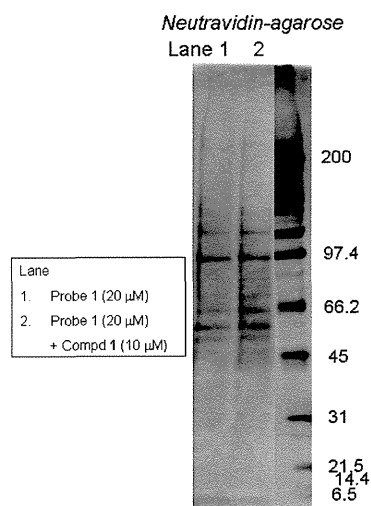


Figure 3. Western blotting of probe-reacted cell lysate.



(Figure 2)。

続いて、同様の実験を化合物の活性評価に用いる MAGI 細胞に対して行った (Figure 3)。その結果、プローブ 1 を用いた場合にタンパク質が検出された。しかしながら、競合剤として化合物 1 を加えた場合にも、それらのバンドは検出され、H9IIIIB

細胞を用いた場合と異なる結果となった。

(倫理面への配慮)

該当事項なし（ヒトや動物を用いた実験を含まない）

D. 考察

H9IIIB 細胞を用いたウエスタンブロットの実験結果から、プローブ **1** の光親和性官能基の配置は、プローブ **2** に比較して、タンパク質の検出において有利であることがわかった。また、プローブ **1** が多くのタンパク質を検出したこと、またそれらのタンパク質のバンドが競合剤の存在下において検出されなかったことから、これらのタンパク質が PD 404182 と結合していることが示唆された。この結果から、PD 404182 は複数のタンパク質に作用して抗 HIV 活性を示す可能性が示唆された。一方で、MAGI 細胞を用いて行った際に検出されたバンドが競合剤の存在下でも検出されたため、プローブがタンパク質と非特異的に結合している可能性も考えられる。

E. 結論

平成 22 年度に開発したプローブを用いてタンパク質のビオチン標識化とウエスタンブロットによる検出を行った。その結果、数種類のタンパク質のバンドが検出された。H9IIIB 細胞、MAGI 細胞のどちらの細胞を用いても同様の実験結果が得られるように条件を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

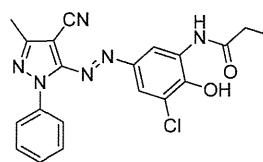
該当事項なし

1-6 : 新規抗 HIV 活性小分子化合物構造最適化研究 (平成 24 年度)

A. 研究目的

研究グループでは、新規抗 HIV 活性化合物の探索を目的としたランダムスクリーニングを行い、ピラゾール骨格を有する化合物 **1** が高い抗 HIV 活性を示すことを見出した。本化合物の抗ウイルス活性はこれまで報告されておらず、新規高活性誘導体の創製を目指して構造活性相関研究を展開した。

Figure1. Structure of compound 1.



$$EC_{50} = 0.32 \pm 0.040 \mu\text{M}$$

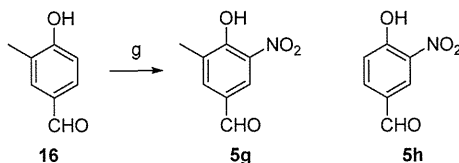
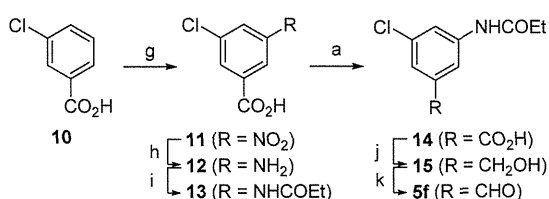
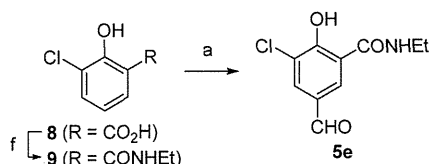
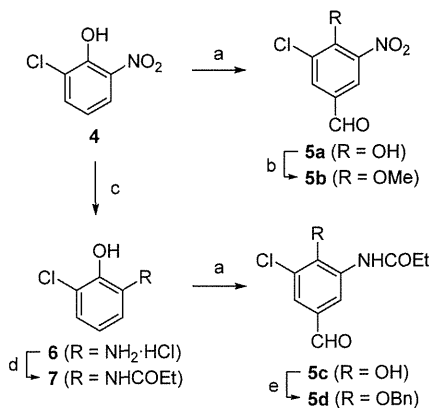
$$CC_{50} = 10 \mu\text{M}$$

B-D. 研究方法・結果・考察

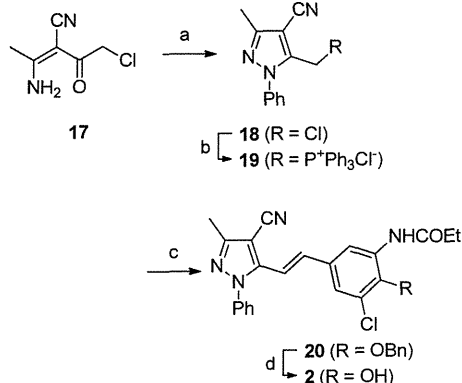
化合物の合成

まず、様々な置換基を有するベンズアルデヒド **5** の合成を行った (Scheme 1)。市販のフェノール **4** を Duff 法によりホルミル化して **5a** を得た。メトキシ体 **5b** は、**5a** の

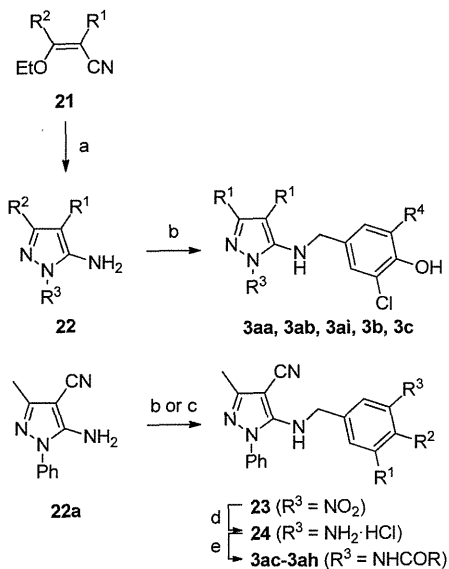
Scheme 1. Synthesis of aldehydes 5. Reagents and conditions: (a) hexamethylenetetramine, AcOH, 110 °C or 130 °C; (b) MeI, K₂CO₃, DMF, rt; (c) FeCl₃, NH₂NH₂·H₂O, activated carbon, *i*-PrOH, 80 °C, then 4M-HCl/1,4-dioxane; (d) EtCOCl, pyridine, THF, rt; (e) BnBr, K₂CO₃, 60 °C; (f) CBr₄, Et₃N, EtNH₂, PPh₃, CH₂Cl₂, rt; (g) H₂SO₄, HNO₃, 0 °C to rt; (h) Fe, NH₄Cl, *i*-PrOH, H₂O, 90 °C; (i) EtCOCl, Et₃N, THF, 0 °C to rt; (j) EtOCOCl, Et₃N, THF, -10 °C, then NaBH₄, MeOH, 0 °C to rt; (k) PCC, CH₂Cl₂, rt.



Scheme 2. Synthesis of compound **2**. *Reagents and conditions:* (a) PhNHNH₂, AcOH, MeOCH₂CH₂OH, 105 °C; (b) PPh₃, toluene, 110 °C; (c) *n*-BuLi, THF, 0 °C, then **5d**, THF, rt; (d) TMSI, MeCN, 80 °C.



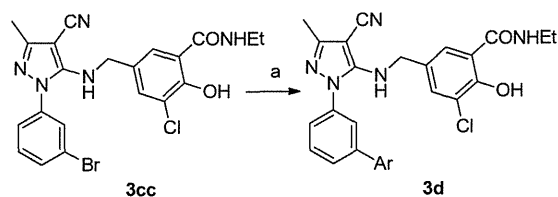
Scheme 3. Synthesis of compounds **3a-3c**. *Reagents and conditions:* (a) R³-NHNH₂, EtOH, rt; (b) **5**, PPTS, toluene, reflux, LiBH₄, THF, 0 °C to rt; (c) **5**, TsOH, toluene, reflux, then NaBH₄, EtOH, 0 °C to rt; (d) FeCl₃, NH₂NH₂·H₂O, activated carbon, *i*-PrOH, 80 °C, then 4M-HCl/1,4-dioxane; (e) RCO₂H, EDC, HOBT, DIPEA, DMF, 45 °C.



メチル化により得た。また、化合物 **5** のニトロ基を還元し、アミド化、ホルミル化を経て **5c** を得た。続いて、ベンジル化を行い、**5d** を合成した。化合物 **8** とエチルアミンの縮合、ホルミル化により **5e** を得た。3-クロロ安息香酸 **10** のニトロ化に続く、ニトロ基の還元、アミド化、カルボン酸の還元、PCC 酸化により、**5f** を得た。化合物 **16** をニトロ化し **5g** を得た。なお、化合物 **5h** は市販品である。

次に、スチレン誘導体 **2** の合成を行った (Scheme 2)。まず、化合物 **17** とフェニルヒドラジンの縮合によって、ピラゾール誘導体 **18** を得た。**18** から誘導したホウホニ

Scheme 4. Synthesis of compound **3d**. *Reagents and conditions:* (a) Ar-B(OH)₂ or Ar-Bpin, Pd(dba)₂, PCy₃, K₃PO₄, 1,4-dioxane, H₂O, 80 °C.



ウム塩 **19** とアルデヒド **5d** の Wittig 反応により **20** を得た。続いて、ベンジル基の脱保護により目的とする誘導体 **2** を得た。

続いて、化合物 **3** の合成を行った (Scheme 3)。ニトリル **21** とアリールヒドラジンとの反応により **22** を得た後、アルデヒド **5** との還元的アミノ化により目的とする化合物 **3aa**, **3ab**, **3ai**, **3b**, **3c** を得た。ニトロベンズアルデヒド誘導体 **5a**, **5b**, **5g**, **5h** と **22a** との反応により得られた **23** は、ニトロ基の還元とアシル化により目的とする化合物 **3ac-3ah** へ誘導した。

化合物 1-ビアリーール-1*H*-5-アミノピラゾール誘導体 **3d** は、化合物 **3cc** とアリールボロン酸 (ピナコールエステル) との反応により合成した (Scheme 4)。

抗 HIV 活性評価

合成した化合物について、NCK アッセイを用いて抗 HIV 活性の評価を行い、構造活性相関情報を取得した (Table 1-4)。

ジアゾ構造は、腸内細菌により容易に代謝・分解を受けることが知られている。そこで、まず、代謝安定性が高くジアゾ構造の等価体となる構造を探索することを目指し、スチレン誘導体 **2**、及び、ジアゾ構造をアミノメチレン基に変換した誘導体 **3aa** をデザインした (Figure 2)。スチレン誘導体 **2**、及び、5-アミノピラゾール構造を有

Figure 2. Structures of compounds **2** and **3aa**.

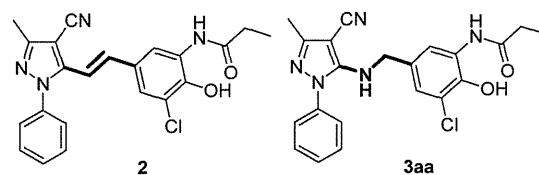
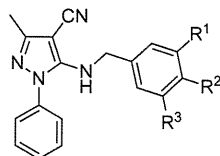


Table 1. SARs on linkage moiety.

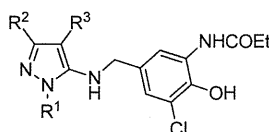
compound	EC ₅₀ (μM) ^a
1	0.32 ± 0.04
2	0.44 ± 0.12
3aa	0.36 ± 0.11

^a EC₅₀ values represent the concentration of compound required to inhibit the HIV infection by 50%.

Table 2. SARs on benzyl group.

compound	R ¹	R ²	R ³	EC ₅₀ ^a (μM)
3aa	NHCOEt	OH	Cl	0.36 ± 0.11
3ab	NHCOEt	H	Cl	>10
3ac	NHCOEt	OMe	Cl	>10
3ad	NHCOEt	OH	H	>10
3ae	NHCOEt	OH	Me	>10
3af	NHCOMe	OH	Cl	>1.0 ^b
3ag	NHCO <i>n</i> -propyl	OH	Cl	3.30 ± 0.89
3ah	NHCO <i>n</i> -pentyl	OH	Cl	>10
3ai	CONHEt	OH	Cl	>1.0 ^b

^a EC₅₀ values represent the concentration of compound required to inhibit the HIV-1 infection by 50%. ^b Cytotoxicity was observed at 10 μM

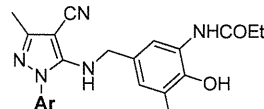
Table 3. SARs on pyrazole ring.

compound	R ¹	R ²	R ³	EC ₅₀ ^a (μM)
3aa	Ph	Me	CN	0.36 ± 0.11
3ba	Ph	H	CN	>1.0 ^b
3bb	Ph	Me	H	>10
3bc	Me	Me	CN	>10
3bd	<i>c</i> -hexyl	Me	CN	>1.0 ^b
3be	Ph	Et	CN	>10
3bf	Ph	Ph	CN	>10
3bg	Ph	Me	CO ₂ Me	>1.0 ^b

^a EC₅₀ values represent the concentration of compound required to inhibit the HIV-1 infection by 50%. ^b Cytotoxicity was observed at 10 μM

する化合物 **3aa** はいずれもリード化合物 **1** に匹敵する活性を示し、これらの構造がジアゾ構造の等価体として利用可能であることが示唆された (Table 1)。そこで、より活性が高い **3aa** をもとに構造活性相関研究を展開した。

まず、右側のベンゼン環上の置換基の構造要求性を検討した (Table 2)。まず、水酸基やクロロ基を除去したところ、活性が消失した (**3ab**、**3ad**)。続いて、水酸基をメチル化、もしくは、クロロ基をメチル基に置換したが、いずれも活性は向上しなかった (**3ac**、**3ae**)。これらの結果は、水酸基やクロロ基が、標的分子との相互作用等において重要な役割を果たしていることを示唆している。続いて、アミド構造について検討した。しかしながら、アルキル鎖を短くした場合も、長くした場合でも活性は低下した (**3af**–**3ah**)。なお、化合物 **3af** と **3ai** では 10 μM において細胞毒性が認められた。

Table 4. SARs on aryl group on pyrazole moiety.

compound	Ar	EC ₅₀ ^a (μM)
3aa	R = H	0.36 ± 0.11
3ca	R = OMe	>10
3cb	R = Me	0.37 ± 0.11 ^b
3cc	R = Br	>0.1 ^c
3cd	R = F	0.33 ± 0.12 ^b
3ce	R = CF ₃	>0.1 ^c
3cf	R = NO ₂	>1.0 ^b
3cg	R = Ph	0.13 ± 0.03 ^c
3ch	R = NHCOCH ₃	>10

3ci		>1.0 ^b
3cj		>1.0 ^b
3ck		>1.0 ^b
3cl		>1.0 ^b
3cm		>1.0 ^b
3cn		>0.1 ^c
3co		>10
3cp		>1.0 ^b
3cq		>10

^a EC₅₀ values represent the concentration of compound required to inhibit the HIV-1 infection by 50%. ^b Cytotoxicity was observed at 10 μM. ^c Cytotoxicity was observed at 1.0 μM.

次に、ピラゾール環上の置換基効果を検討した (Table 3)。3-メチル基や4-シアノ基を除去したところ、活性が大幅に低下した

(3ba, 3bb)。また、ベンゼン環のメチル基やシクロヘキサン環への変換、3-メチル基のエチル基やフェニル基への変換、シアノ基のメトキシカルボニル基への変換等さまざまな検討を行ったが活性は向上しなかった (3bc, 3bg)。

ピラゾール N-1 位のフェニル基上の置換基効果を検討した (Table 4)。ベンゼン環のメタ位にメチル基やフルオロ基、フェニル基を導入したところ、3aa と同等か高い活性を有する誘導体が得られた (3cb, 3cd, 3cg)。一方で、メトキシ基やブロモ基、トリフルオロメチル基、ニトロ基、アセチルアミノ基を導入した場合には活性の低下が認められた (3ca, 3cc, 3ce, 3cf, 3ch)。パラ位、メタ位へのメチル基の導入も活性が低下した (3ci, 3cj)。また、3位と5位をジクロロ化した化合物でも、活性の低下が認められた (3ck)。フェニル基を、ナフチル基、ピリジル基、キノリル基に変換したところ活性は低下した (3cl-3cq)。

続いて、良好な活性を示したビフェニル体 3cg をもとにさらなる高活性誘導体を創製するため、*m*-フェニル基の置換基効果を精査した (Table 5)。オルト位、メタ位、パラ位にそれぞれメトキシ基、メチル基、クロロ基を導入した誘導体のうち、*o*-クロロ体 3dc では活性が維持され、メタ位、もしくはパラ位にメチル基を導入した化合物では活性の向上が認められた (3de, 3dh)。また、ジクロロ体 3dj も高い活性を示した。ナフチル基、ピリジル基、キノリル基を導入した場合は活性が低下した。

(倫理面への配慮)

該当事項なし (ヒトや動物を用いた実験を含まない)

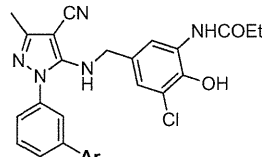
E. 結論










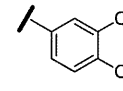
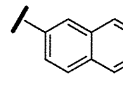
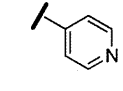
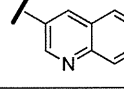
ランダムスクリーニングにより見出した抗 HIV 活性を有するピラゾール誘導体 1 の構造最適化を展開し、リード化合物に比較して約 6 倍強力な抗 HIV 活性を示す誘導体 3dj を見出した。また、今後のさらなる高活性誘導体の創製につながる興味深い構造活性相関情報を取得した。

F. 健康危険情報

該当事項なし

Table 5. SARs on biaryl group on pyrazole moiety.



compound	Ar	EC ₅₀ ^a (μM)
3da		R = OMe >0.1 ^c
3db		R = Me >0.1 ^c
3dc		R = Cl 0.25 ± 0.13 ^b
3dd		R = OMe >0.1 ^c
3de		R = Me 0.06 ± 0.01 ^c
3df		R = Cl >0.1 ^c
3dg		R = OMe >0.1 ^c
3dh		R = Me 0.10 ± 0.04 ^c
3di		R = Cl >0.1 ^c
3dj		0.05 ± 0.01 ^c
3dk		>0.1 ^c
3dl		>1.0 ^b
3dm		>0.1 ^c

^a EC₅₀ values represent the concentration of compound required to inhibit the HIV-1 infection by 50%. ^b Cytotoxicity was observed at 10 μM. ^c Cytotoxicity was observed at 1.0 μM.

分担研究項目 3 : 新規 CXCR4 拮抗作用に基づく新規抗 HIV 剤の創製

3-1 : 塩基性官能基の導入による新規 CXCR4 拮抗剤の創製 (平成 22 年度)

A. 研究目的

ケモカイン受容体 CXCR4 は HIV-1 の宿主細胞への侵入時のコレセプターであることから、CXCR4 拮抗剤は HIV 関連疾患の有力な治療薬になるものと期待されている。

研究グループではこれまでに、強力な CXCR4 拮抗活性を示す環状ペプチド FC131 (1)を開発し、種々のペプチドミメティクスを導入した誘導体による構造活性相関研究を展開してきた (Figure 1)。

一方、他グループが開発した低分子 CXCR4 拮抗剤 AMD3100 や AMD11070 等は分子内に 3 つ以上の塩基性官能基を有しており、これらの官能基が CXCR4 受容体内の酸性アミノ酸側鎖と相互作用し、活性